

# 微生物を由来とする機能性タンパク質の 医用工学的応用に関する研究

田端 厚之<sup>1\*</sup>, 坂倉 永里子<sup>2</sup>, 友安 俊文<sup>1</sup>, 長宗 秀明<sup>1</sup>

## A Study on Functional Protein Tool Derived from Bacterial Products for Clinical Engineering Application

by

Atsushi TABATA, Eriko SAKAKURA, Toshifumi TOMOYASU, Hideaki NAGAMUNE

A study on novel functional protein tool derived from bacterial products was carried out. This tool is composed of two parts, a functional domain to exhibit regulated cytotoxicity and a targeting domain to recognize the target cell, and these domains are connected with a chemical linker. A *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (ETA) deficient in its receptor-binding domain, named  $\Delta$ BD-ETA, was adopted as the functional domain.  $\Delta$ BD-ETA was expressed in *Escherichia coli* expression system and purified by Ni-NTA affinity chromatography. Purified  $\Delta$ BD-ETA indicates no cytotoxicity to human lung carcinoma A549 at the concentrations showing severe cytotoxicity of wild-type ETA. A recombinant single chain Fv (ScFv) derived from anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody, named anti-CEA-ScFv, was selected as the targeting domain. In contrast to  $\Delta$ BD-ETA, anti-CEA-ScFv was difficult to express stably as functional targeting domain against CEA. Thus, the construction of functional protein tool has not been completed at the moment. However, further attempts to overcome the problem including the preparation of alternative/improved functional protein tool are in progress.

**Key words:** Exotoxin A, Functional Protein Tool, Clinical Engineering Application,  
ScFv, Bacterial Protein Toxin

- 
- 1 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部  
Department of Biological Science and Technology,  
Life System,  
Institute of Technology and Science,  
The University of Tokushima Graduate School
  - 2 徳島大学大学院先端技術科学教育部  
Graduate School of Advanced Technology and Science,  
The University of Tokushima

\*連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1  
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

### 1. まえがき

我々の生活環境には実に様々な微生物が存在しており、直接その姿を認識する機会多くはないかもしれないが、我々の日常生活に様々な影響を与えている。その影響には、我々にとって有益なものもあれば、その反対に不利益なものもある。前者の例としては、我々の腸管内に常在している乳酸桿菌などが挙げられる。この菌はヒトの腸内環境を適切に維持する作用を示し、「プロバイオティクス」の代表的な菌として我々の健康維持に関連して述べられることが多い。一方、不利益な例と

しては、食品の微生物汚染や感染症がある。これらは、ともすると我々の生命にかかわるほどの重大な事態へと発展しかねない。記憶に新しい事例として、1997 年に大阪府堺市を中心に大きな健康的被害を出した腸管出血性大腸菌 O157 による集団感染事例や、2000 年に発生した某乳業メーカー製品を原因とした集団食中毒の発生などがあり、いずれも我々の生活環境に大きな影響を及ぼした。このような事例も含め、一般的に「微生物」と言って連想されるのは我々にとって不利なことが多い。さらに、上記のような微生物を原因とした健康被害に関しては、その原因因子が当該微生物から産生される毒素タンパク質であることが多く、従って毒素タンパク質は明確な敬遠対象として認識されている。

しかしながら、近年の科学研究、特にバイオテクノロジー分野の進展によって、微生物が産生する毒素タンパク質は単なる危険因子としてではなく、その分子構造や機能を詳細に解析することによって、これまでは着目されなかった新たな機能や構造単位を見出すことが可能になってきた。具体的には、分子生物学の進展によって対象の毒素タンパク質を組換え体として大腸菌などを用いて大量調製することが可能となり、毒素タンパク質の結晶構造解析が進んで構造的な情報を得ることが可能になってきた。また、遺伝子組換え技術やタンパク質工学の発展によって、対象毒素タンパク質に対して様々な分子修飾を施した変異体を作製する技術が確立され、その変異体の機能について野生型と比較検討することで毒素活性や機能に重要な構造単位を特定することが可能となった。これらの手法を駆使することによって、従来は単に毒素タンパク質として大きくひとまとめで認識していた分子も、機能的に重要な幾つかの部分構造に分けることができ、さらにその情報をうまく利用することによってこれまでに存在しなかった新たな機能性分子を設計・構築することが可能な状況となっている。このような背景のもとで、我々の研究室では、様々な微生物が産生するタンパク質、特に毒素タンパク質について上記の実験手法を用いて検討を行い、新たな機能を有す微生物由来の新規機能性タンパク質の創成とその応用について研究を展開している<sup>1)</sup>。

これまで我々の研究室では、グラム陽性細菌である *Streptococcus* 属細菌が産生する毒素タンパク質であり、作用機構として標的細胞膜に対して膜孔を形成することによって細胞障害性を示すことが報告されているコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC)<sup>2)</sup> に関して一連の研究を行っており、これまでに CDC の機能特性を利用した新規機能性分子を設

計してその機能や有用性を報告してきた<sup>3, 4)</sup>。この機能性分子は、標的とする細胞に分子を送達するための標的部 (Targeting domain) と毒素タンパク質本来の機能を利用した機能部 (Functional domain) から構成されており、機能部の一部には運搬対象 (薬剤などを内包させたりリボソームなど) を結合させるための領域を備えた構造となっている。具体的な構造として、標的部として肺癌細胞を優先的に認識して結合するペプチドである lung tumor specific peptide (LTSP)<sup>5)</sup>、機能部として制御性の膜孔形成能を示す CDC 変異体を採用しており、我々が作製した上記の機能性分子は期待した機能を発揮する分子であった。しかしながら、上記の分子設計ストラテジーではその対象や使用用途にかなりの制約があるので、汎用性に欠けるという問題が生じる。これらの問題の対処策として、①標的部としてより汎用性が高く、様々な標的細胞に対して臨機応変に対応できるような分子を採用すること、②機能部に従来の CDC 以外の分子 (膜孔形成による細胞障害活性以外の生理活性を示す微生物由来のタンパク質毒素) を採用すること、の 2 点を新たに提案し、それらを満たしたより汎用性の高い新規機能性タンパク質の構築を目指した。

本研究プロジェクトでは、まず標的部に必要な条件を満たす分子として、抗体分子の一本鎖可変領域断片 (ScFv) の採用を検討した。また機能部としては、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) が産生する外毒素である exotoxin A (ETA) を選択し、ETA に対して遺伝子工学的手法を用いてその毒素活性を制御できるように改変した機能分子を作製して検討した。そして、標的部と機能部をそれぞれ別個に調製して両者をリンカー化合物で化学的に連結するという分子設計を採用することによって、従来の機能性分子とは異なり汎用性の高い新規機能性分子の調製を検討した。このようなシステムで構成される新規機能性タンパク質は、それぞれの部位 (標的部と機能部) を状況に応じて適宜変更して調製できるということで、特に近年注目されている疾患のテーラーメイド型治療に際して有用なツールとなることが期待される分子である。

## 2. 方法

### 2.1 新規機能性タンパク質の分子設計

今回検討を行った新規機能性タンパク質は、標的細胞に送達するための標的部と毒素タンパク質本来の機能を利用した機能部の両部位より構成される (Fig. 1)。このうち、機能部として、今回は *P. aeruginosa* が産生する ETA に注目した。ETA の作用機構はタンパク質合成阻害であり、具体的には細胞のタ

ンパク質合成に重要な因子である elongation factor-2 を ADP-リボシル化することによってタンパク質合成を阻害する。ETA は標的細胞の細胞膜に存在する  $\alpha 2$ -マクログロブリン受容体に結合し、標的細胞の受容体依存性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、その酵素活性を発揮するとされている<sup>6,7)</sup>。ETA の分子構造は3つのドメイン(受容体結合ドメイン、細胞内移行ドメイン、毒素活性ドメイン)から構成され、このうち ETA の酵素活性(ADP-リボシル化活性)を担う本体は毒素ドメインであるドメイン III である。一方ドメイン Ia は受容体結合部位であり、このドメイン Ia を介して細胞に結合して作用を発揮する。従って、このドメイン Ia を欠失させてドメイン II と III (両ドメインの連結部である Ib を含む)で構成される分子を構築すれば、ETA の本来の毒素活性の本体は保持したまま細胞外からの細胞障害性を大幅に低減させた改変 ETA の分子構築が可能である<sup>8)</sup>。

一方、標的部としては抗体を選択したが、抗体分子そのままを連結させた場合では、分子の高さのために毒素との連結反応効率に悪影響が出る可能性が考えられた。そこで今回は、目的の抗体の ScFv を作製して用いることとした。ScFv とは、抗体分子の変換領域の重鎖(V<sub>H</sub>)と軽鎖(V<sub>L</sub>)をリンカー構造で

連結した組換えタンパク質であり、抗体分子そのものと比較すると分子量が小さく、標的抗原以外との非特異的な接触面積が少ない分子であり、さらに組換えタンパク質ということで大腸菌発現系を用いて容易に大量調製が可能であるという利点を有す。今回の検討では、臨床現場において癌疾患の補助診断に用いられる腫瘍マーカーの一種である癌胎児性抗原(CEA)を抗原として選択し、CEA に対する一本鎖可変領域断片を作製して標的部として用いた。

なお、標的部と機能部はそれぞれ別個に調製するため、実際の機能性タンパク質作製にはこの両者を連結する必要がある。今回は、リンカー化合物を連結に用いることとし、そのリンカーで連結するために必要な構造単位を付加したタンパク質分子を調製した。具体的には、リンカー化合物として分子内にマレイミド基と NTA 基を有する分子を用いる。そして、マレイミド基と反応性を示すスルフヒドリル基を側鎖に有するシステイン残基を N 末端側に付加した機能部である ETA 変異体と、NTA 基とニッケルイオンを介してキレート形成して結合する6個のヒスチジン残基の連続構造(His-tag)を C 末端側に連結させた標的部の ScFv を調製した(Fig. 1)。

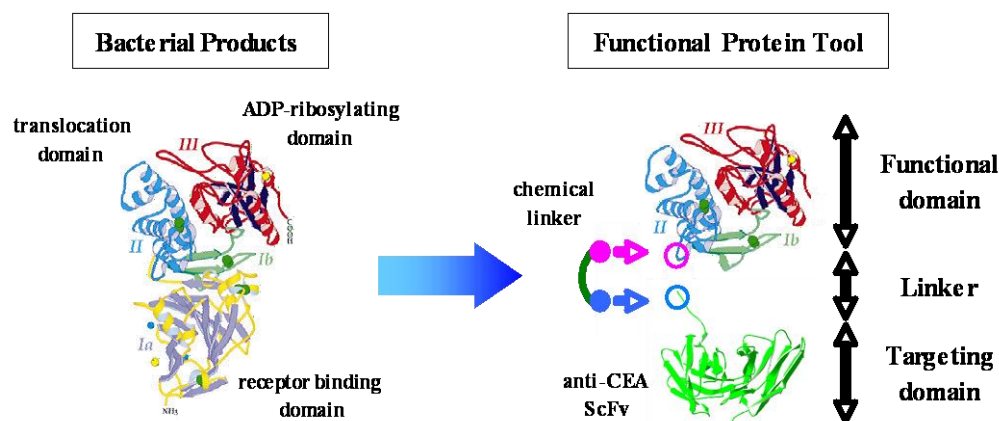


Fig. 1: Molecular model of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A for an example of bacterial products and its derivative, *Functional Protein Tool*, studied in this study.

## 2. 2 WT-ETA および $\Delta$ BD-ETA 発現系の構築と精製

まず、*P. aeruginosa* PAO1 由来株より染色体 DNA を調製した<sup>9)</sup>。調製した染色体 DNA 溶液を用いて ETA 遺伝子の全長配列を PCR クローニングし、この遺伝子を鋳型としてシグナルペプチドを欠失させた成熟型 ETA (WT-ETA) およびシグナルペプチドから受容体結合ドメインを欠失させた ETA 変異体 ( $\Delta$ BD-ETA) の各発現系を構築した。なお、機能性ツールの構築に必要なリンカー結合部として N 末端側にシステイン残基を導入した設計とし、機能部を構成するタンパク質の発現系を構築した。

WT-ETA および  $\Delta$ BD-ETA の精製方法については、これらのタンパク質がその N 末に His-tag を有することより、His-tag 化タンパク質精製法の定法に従って行った。精製後のタンパク質は定法により濃度測定後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってその純度を評価した。

## 2. 3 $\Delta$ BD-ETA の機能部としての評価

ヒト肺癌細胞株 A549 およびヒト正常線維芽細胞株 NB1RGB をそれぞれ  $5 \times 10^3$  cells/well となるように 96 穴プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養した。培養後、培地を除去し、所定濃度となるように細胞培養培地で希釈した WT-ETA および  $\Delta$ BD-ETA を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 48 時間培養した。48 時間培養後の生存率の算出は、細胞内のミトコンドリアの酸化還元活性を指標にした評価系である WST-1 (Dojindo) を用いた測定系で行った。

また、WT-ETA および  $\Delta$ BD-ETA の細胞障害性の形態的観察では、A549 に対して共に 10ng/mL の濃度で各 ETA 組換え体を作用させ、顕微鏡 (倒立型リサーチ顕微鏡 IX71、OLYMPUS) を用いて観察した。

## 2. 4 一本鎖可変領域断片発現系の構築と精製

抗 CEA 抗体を産生する培養細胞 (T84.66A3.1A.1F2) を定法に従って培養し、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて総 RNA を抽出し、High Capacity cDNA reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調製した。調製した cDNA を鋳型として、ScFv 作製キットである Mouse ScFv Module (Amersham) を用いて、キット付属説明書に従い抗 CEA 抗体の ScFv 遺伝子を作製した。作製した遺伝子断片を、目的タンパク質の C 末端に His-tag が付加されるように設計された発現ベクターに挿入して発現系を構築した。完成した抗 CEA-ScFv 発現ベクターの遺伝子配列を確認

後、組換えタンパク質発現用大腸菌を形質転換し、目的タンパク質の発現を確認した。

抗 CEA-ScFv の精製方法については、C 末に His-tag を有することより His-tag 化タンパク質精製法の定法に従って試みた。精製後のタンパク質は定法に従って濃度測定後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってその純度を評価した。

## 2. 5 抗 CEA-ScFv の標的部としての評価

CEA 陽性細胞として CEA 産生大腸癌株 LoVo、および CEA を発現していないコントロール細胞として NB1RGB を用いた。96 穴プレートに LoVo は  $2 \times 10^5$  cells/well、NB1RGB は  $4 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 2 日間培養した。培養後、培地を除去してリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1 回洗浄操作を行い、4% パラホルムアルデヒドを用いて細胞の固定処理を行った。固定後の細胞を PBS で洗浄後、1% ウシ血清アルブミンを含んだ PBS 溶液を用いてブロッキングを行った。その後、所定濃度となるように段階希釈した抗 CEA-ScFv 溶液を反応させ、以後は酵素免疫測定 (EIA) 法の定法に従って抗体反応および発色反応を行った。なお一次抗体としては抗 His-tag 抗体を用い、horseradish peroxidase (HRP) による基質 (今回は ABTS を使用) の発色反応を測定することにより測定を行った。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 機能性タンパク質の分子設計

Fig. 1 において模式的に示した新規機能性タンパク質は構造的に 2 つの部位 (標的部と機能部) に分かれているが、今回はそれらを敢えてキメラタンパク質としては調製せずに、それぞれ単独に発現させて精製するストラテジーをとった。その理由としては、まずキメラタンパク質として発現させた場合は、ある程度の分子量を持った異種生物由来のタンパク質が形成されることになるため、想定外の分子内相互作用などが生じて目的タンパク質が発現しないか、もしくは発現したとしても機能型としての調製が困難となる可能性が考えられたからである。次に、機能性タンパク質を用いた応用研究の今後の展開を考えた場合、2 つのドメインを一緒に調製するよりは、別個に調製してそれらを組み合わせるという方針により用途の汎用性が広がるからである。また、標的部に ScFv を採用したことにより、抗体分子そのものを使用する場合と比較して、組換えタンパク質の発現系として確立されている大腸菌発現系を用いて容易にかつ大量に調製できるという点も大きな利点である。このよう

に、将来的に実用化を考慮した上でも、今回の機能性分子は様々なメリットを兼ね備えた分子設計となっている。

### 3. 2 $\Delta$ BD-ETA の調製と機能部としての評価

ETA はタンパク質合成阻害を示す毒素タンパク質であるが、その毒素活性は ETA のドメイン Ia(受容体結合部)が受容体である  $\alpha$ 2-マクログロブリン受容体と結合することを引き金とした細胞内への受容体依存性エンドサイトーシスによって開始される。従って、ETA の受容体結合ドメインである Ia を欠失させることによって、細胞外では無害で細胞に影響を与えず、エンドソームなどを介して細胞内に取り込まれた時点で細胞毒性(ETA の場合はタンパク質合成阻害活性)を発揮する分子を構築することが可能である<sup>8)</sup>。上記戦略に基づいて、受容体結合ドメインである Ia を欠失させ、精製用に分子の N 末端に His-tag を付加した ETA 改変体( $\Delta$ BD-ETA)の発現系を構築した。目的タンパク質の誘導発現を行った結果を、Fig. 2A に示す。また誘導発現したタンパク質が目的のタンパク質であるかについて、抗 His-tag 抗体を用いたイムノブロットの反応性と、バンドが示す分子量(約 42 kDa)を基に判断した。こ

の発現タンパク質を、Ni-NTA カラムを用いた親和性クロマトグラフで精製した(Fig. 2C)。今回構築した  $\Delta$ BD-ETA 発現系では、1L 培養分の大腸菌体から総量約 3.5mg の目的タンパク質を調製することができた。

続いて、 $\Delta$ BD-ETA の細胞障害活性を WT-ETA と比較した結果、A549 に対する  $\Delta$ BD-ETA と WT-ETA の 50%致死濃度( $LD_{50}$ )には約 5000 倍もの差が確認された(Fig. 3A)。一方、NB1RGB においても同様に、 $\Delta$ BD-ETA と WT-ETA の  $LD_{50}$  を比較検討すると細胞毒性は約 5000 倍もの差が確認され、従って  $\Delta$ BD-ETA は WT-ETA と比較して、受容体依存的な細胞外界環境からの細胞障害性が十分制御されていることが確認された。

$\Delta$ BD-ETAの細胞障害活性の低減化については、顕微鏡を用いた細胞の形態観察によっても確認した。WT-ETAで細胞障害性が発揮される濃度(10ng/mL)の $\Delta$ BD-ETAをA549に作用させた結果、3日間培養後でもA549に対する細胞障害性は全く確認されず、順調な増殖を示した(Fig. 4D)。従って、受容体結合ドメインIaを欠失させることによってETAの細胞毒性が大幅に低減されたことが確認できた。

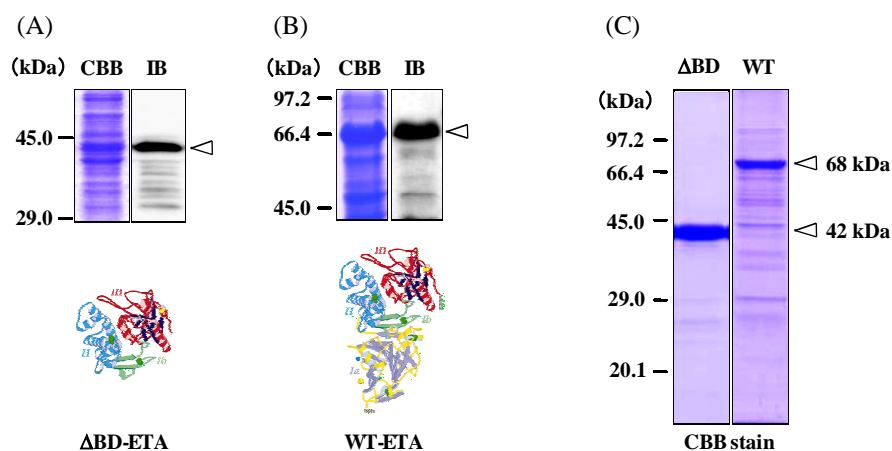


Fig. 2: Expression and purification of the recombinant proteins derived from *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. The receptor-binding domain deficient mutant  $\Delta$ BD-ETA as the functional domain of *Functional Protein Tool* (A) and wild-type WT-ETA (B) were expressed in bacterial expression system, and detected by CBB staining and immunoblotting using anti-His-tag antibody. These recombinants were purified by Ni-NTA affinity chromatography (C).

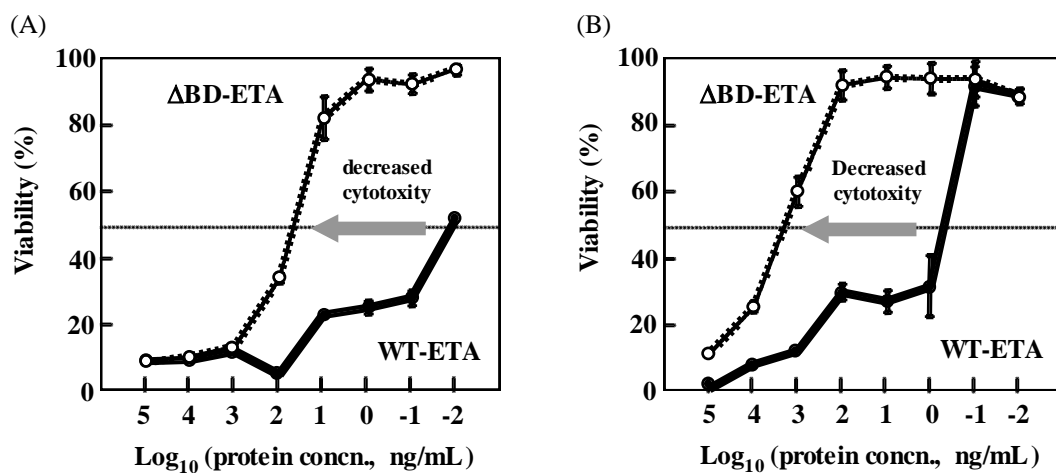


Fig. 3: Cytotoxic effects of wild-type exotoxin A (WT-ETA) and its receptor-binding domain deficient mutant  $\Delta$ BD-ETA on a human lung carcinoma cell line A549 (A) and a normal human skin fibroblast cell line NB1RGB (B). Remarkable decrease in cytotoxicity was observed in the treatment with  $\Delta$ BD-ETA compared to with WT-ETA.

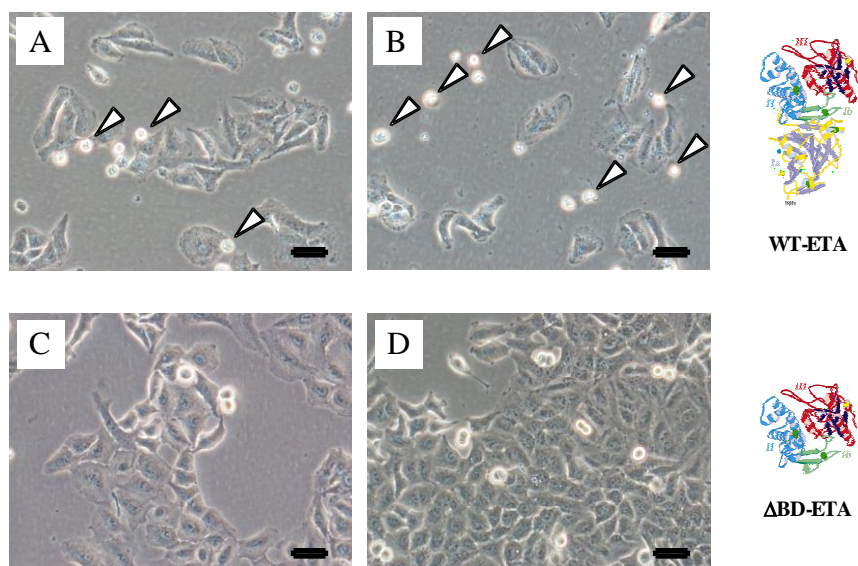


Fig. 4: Morphological observation of the cytotoxic effect of wild-type exotoxin A (WT-ETA) and its receptor-binding domain deficient mutant ( $\Delta$ BD-ETA) on a human lung carcinoma cell line A549. WT-ETA (A, B) and  $\Delta$ BD-ETA (C, D) were reacted with A549 at the concentration of 10 ng/ml, then the morphological change was observed after 2 days (A, C) and 3 days (B, D) cultivation. White arrowheads indicate the dead cells by the action of WT-ETA. Bars: 50  $\mu$ m



### 3. 3 抗 CEA-ScFv の調製と標的部としての評価

抗原タンパク質に対して特異的且つ高い親和性を持って認識・結合できる抗体分子は、我々が求めている機能性タンパク質の標的部として魅力的な分子であるが、分子自体がかなり嵩高いことに加え、異なる2ペプチドで機能単位となるために、改変体を大腸菌で機能的に発現するには効率が悪くなることから、今回の目的に使用するのは限界がある。そこで、抗体分子の抗原認識特性を維持したまま、比較的低分子量のタンパク質として大腸菌発現系を用いて調製が可能な ScFv に注目した。抗 CEA モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマから抗体分子をコードしている遺伝子断片をクローニングし、その遺伝子を用いて抗 CEA-ScFv 発現ベクターを作製した。この発現ベクターで形質転換した大腸菌を用いて目的タンパク質の発現確認を行ったところ目的サイズ付近にバンドが確認され、イムノブロットの結果より目的タンパク質が His-tag を有していることが確認された (Fig. 5)。

続いて、His-tag に対する親和性クロマトグラフィーにより、目的タンパク質の精製を試みた。まず非変性系での精製を試みたところ、その精製タンパク質量は少なく、純度も十分ではなかった。そこで、次にタンパク質変性剤である Urea を用いた変性系での精製について検討した結果、先の非変性系よりも精製純度は向上したが、目的タンパク質の量は非変性系と比較してさらに劣ることが示された。以上より、結果として抗 CEA-ScFv についてはその調製が困難であった。

しかしながら、粗精製標品であっても、その中に目的とするタンパク質が存在すれば、その機能評価は可能であると考えられるため、調製した抗 CEA-ScFv 粗精製分画の反応性を、CEA 発現細胞株の LoVo と、その陰性コントロールとして CEA を発現していない NG1RGB を用いて検討した。その結果、期待通り抗 CEA-ScFv 粗精製分画の濃度依存的に LoVo に対する顕著な結合性が確認されたが、NB1RGB においても有意な反応性を示す結果となり、今回調製した抗 CEA-ScFv は抗体分子の特性として重要な反応特異性を十分に発揮することはできなかった (Fig. 6)。従って、当初計画していた機能性ツールについて、標的部に抗 CEA-ScFv を用いることは困難であることが結論された。以上、本研究では計画した機能部の調製には成功したが、標的部が予定した特異性を担保することができず、当初計画していた新規機能性分子の構築にまで至らなかった。しかし、この研究を通して得た様々な情報に基づいて、特に標的部の改良に重点を置いた新規機能性タンパク質の構築に関する研究を継続している。

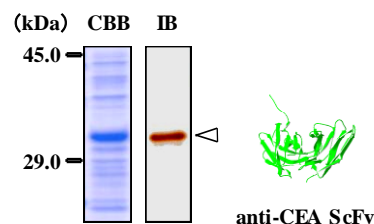


Fig. 5: Expression of the recombinant anti-CEA ScFv as the targeting domain of *Functional Protein Tool*. Anti-CEA-ScFv was expressed in bacterial expression system and detected by CBB staining and by immunoblotting using anti-His-tag antibody.

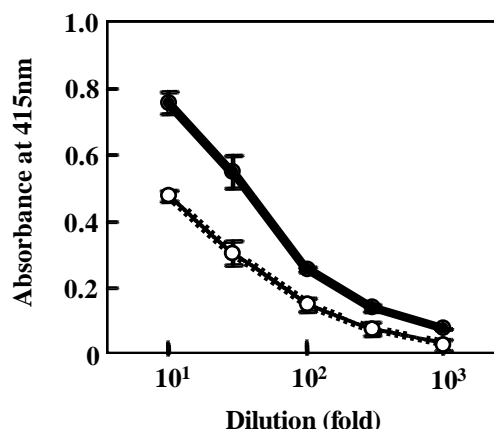


Fig. 6: Evaluation of specificity of the recombinant anti-CEA-ScFv in cell targeting. Anti-CEA-ScFv preparation was reacted with a CEA-expressed cell line LoVo (closed circle) and a normal human skin fibroblast cell line NB1RGB (opened circle), then its binding to each cell line was estimated by EIA.

#### 4. 結言

本研究は、我々にとって敬遠対象である微生物由来の毒素タンパク質を対象としたものであり、その部分構造と機能に注目することによってこれまで見過ごされてきた有益な機能を再発掘し、その機能をうまく制御しながら新規機能性分子としての毒素タンパク質の応用を目指した基礎研究である。特に本プロジェクトでは、従来から展開してきた分子設計ストラテジーをさらに発展させ、より汎用性に長けた新規機能性分子の構築を目指した。結果的には当初計画していた機能性タンパク質を完成させることはできなかったが、今回の検討で得られた様々な知見を生かし、新たな分子を設計して、現在も研究を継続している。本研究で提案した新規機能性タンパク質の分子設計ストラテジーでは汎用性の高い分子の構築が見込まれるので、その応用分野としては、癌治療におけるドラッグデリバリーシステムに関連したテーラーメイド医療分野が挙げられる。本研究成果の応用展開にはまだまだ課題が山積しているが、着実にその有用性が見出されてきており、将来的には医工連携プロジェクトへと発展展開していくことを期待したい。

#### 5. 謝辞

本研究は、平成20年度徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部研究プロジェクトによる研究成果の一部をまとめたものです。本研究の助成を賜りました関係者各位に、深く感謝致します。また、本研究にご協力頂きました皆様に、重ねて厚く御礼申し上げます。

#### 6. 参考文献

- 1) 田端厚之: 今日の敵は明日の友?: 細菌毒素の応用 (バイオメディア), 生物工学会誌, Vol. 85, No. 4, 194 (2007)
- 2) R. K. Tweten: Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins, *Infection and Immunity*, Vol. 73, No. 10, 6199-6209 (2005).
- 3) 田端厚之: 医学的応用に向けた細菌毒素に由来する機能性ナノバイオツールの作製, 平成 19 年度ソシオテクノサイエンス研究部研究報告書 (2009)
- 4) H. Nagamune, K. Ohkura, K. Umezumi, H. Shouji, H. Kourai: A cell membrane modification technique using domain 4 of intermedilysin for immunotherapy against cancer, *Anticancer Research*, Vol. 24, No. 5C, 3367-3372 (2004).

- 5) T. Oyama, K. F. Sykes, K. N. Samli, J. D. Minna, S. A. Johnston, K. C. Brown: Isolation of lung tumor specific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents, *Cancer Letter*, Vol. 202, No. 2, 219-230 (2003)
- 6) A. A. Salyers, D. D. Whitt: Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach, Second Edition, ASM Press, Chapter 16, 255 (2002)
- 7) I. Pastan, D. FitzGerald: Pseudomonas Exotoxin: Chimeric Toxins, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 264, No. 26, 15157-15160 (1989)
- 8) T. Kondo, D. FitzGerald, V. K. Chaudhary, S. Adhya, I. Pastan: Activity of immunotoxins constructed with modified *Pseudomonas* exotoxin A lacking the cell recognition domain, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, No. 19, 9470-9475 (1988)
- 9) T. Goto, H. Nagamune, A. Miyazaki, Y. Kawamura, O. Ohnishi, K. Hattori, K. Ohkura, K. Miyamoto, S. Akimoto, T. Ezaki, K. Hirota, Y. Miyake, T. Maeda, H. Kourai: Rapid identification of *Streptococcus intermedius* by PCR with the *ily* gene as a species marker gene, *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 51, No. 2, 178-186 (2002)